

日本小児感染症学会機関誌「小児感染免疫」総説 (第 41 回日本小児感染症学会教育講演)			
標題	C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構		
	Pathogenic Mechanism of Hepatitis C Virus		
Key words	C 型肝炎ウイルス	肝細胞	NS5A
	Syk	GLUT2	
著者の姓名	定 清直		
	Kiyonao Sada		
所属	福井大学医学部医学科病因病態医学講座微生物学領域		
郵便用宛名	〒福井県吉田郡永平寺町松岡下合月 23-3		
原稿枚数	19 (7522 文字)		
図	8		
表	0		
写真	0		

## 要旨(200 字以内)

C 型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓に慢性の炎症を引き起こし、高率に肝細胞癌や 2 型糖尿病を引き起こすが、詳細な分子機序は不明の点が多い。HCV ゲノム由来の蛋白質は、本来の機能に加え宿主の内因性蛋白質と相互作用し、病理作用を発現する。現在我々は新たに開発された HCV レプリコンシステムや感染実験系を用いて解析を進めており、本稿では最新の知見について紹介する。(神戸大・院医・堀田博教授との共同研究) (196 文字)

## 本文

### HCV 研究のマイルストーン

HCV は従来の培養細胞や実験動物から直接ウイルスを分離する方法ではなく、分子生物学的な手法によりその遺伝子断片がクローニングされた。1989 年、Choo らは輸血後非 A 非 B 型肝炎患者の血漿を接種されたチンパンジーの血漿中から、ウイルス遺伝子の一部を見出し、それにコードされる配列(C100-3 抗原)を用いて血清中の抗体検査を行った。その結果、新たに発見された遺伝子断片が輸血後非 A 非 B 型肝炎の主要な病原ウイルスであることが明らかとなり、C 型肝炎ウイルス *Hepatitis C virus* (HCV)と命名された(1)。その後、全長の遺伝子配列が解明され、ウイルス蛋白質のゲノム構造やスプライシング機構が明らかになった。HCV は通常ヒトのみを宿主とし、培養細胞での感染増殖系が確立出来なかった。そのため研究の進展に支障を来していたが、1999 年に HCV レプリコンシステムが報告され、HCV の細胞内複製機構の解析が可能となった(2)。さらに 2005 年には劇症肝炎患者の急性期血清より分離された HCV 株を用いて、ついに HCV 感染増殖実験系が確立された(3,4)。

### HCV の性状

HCV はフラビウイルス科 *Flaviviridae* ヘプシウイルス属 *Hepacivirus* に分類され、遺伝子は全長約 9600 塩基よりなるプラス鎖 1 本鎖 RNA で、IRES (internal ribosome entry site)を含む 5'非翻訳領域、3'非翻訳領域の間に 1 つの open reading frame (ORF)を持つ(図 1)。ORF から IRES のはたらきにより翻訳された大きな前駆体蛋白質は、宿主とウイルスの蛋白質分解酵素により切断され、3 種類のウイルス構造蛋白質(コア蛋白質、E1 および E2 エンベロープ蛋白質)と 7 種類の非構造蛋白質を生じる(P7 を構造蛋白質に分類する成書もある)。ウイルス粒子は直径 55~65nm の球状粒子で、内部にコア粒子が存在する。コア蛋白質は強い免疫原性を有し、感染者のほとんどが抗コア蛋白質抗体を産生するので、C 型肝炎ウ

ウイルスによる肝炎の診断に用いられている。その他の HCV 蛋白質の性質は図 1 に示す。

HCV の遺伝子型は 60 種類以上あり、地理的分布や肝病原性、インターフェロン感受性が異なる。1a 型は血友病患者に多いがそれ以外は希であり(血液凝固因子製剤の汚染による)、米国やヨーロッパに多い。1b 型はわが国において 70～85%の頻度で見られ、インターフェロンの治療効果は無効であることが多く、肝病原性も強い傾向にある。2a 型はわが国において 10～15%の頻度で、インターフェロンの治療効果は概ね有効である。わが国に関連が深いものとしては、他に 2b、3a、3b 型がある。インターフェロンの治療成績に影響を与える因子としては遺伝子型に加え、血中ウイルス量、感染後の罹病期間、さらにウイルスの NS5A の特定領域(インターフェロン感受性決定領域：ISDR)のアミノ酸配列の差異も重要であると考えられている。

HCV のライフサイクルについては次のように考えられている(5)。感染した HCV はリポ蛋白質と結合して血液中を移動する。肝細胞に感染する際にはエンベロープ蛋白質の E2 が CD81 と SR-B1 に結合し、claudin-1 と occludin を介して細胞内に侵入する。侵入したウイルスは細胞質に放出されて脱核される。HCV の RNA ゲノムは IRES を介して翻訳され、HCV 蛋白質のプロセッシングが行われる。同時に HCV の非構造蛋白質 NS5B にコードされた RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの働きにより HCV のゲノム RNA が複製される。感染した細胞には membranous web という現象が観察される。HCV の複製には脂肪滴(lipid droplet)との密接な関係が明らかとなっている(6)。複製した RNA と HCV 蛋白質により子ウイルスがパッケージングされ、成熟したウイルス粒子は細胞外へ放出される。

### HCV の病原性発現機構

ウイルスの標的細胞は肝細胞と B リンパ球である。肝細胞障害の機序として、ウイルスによる CPE の関与は不明であるが、リンパ球を介する肝細胞障害機構やアポトーシスの関与が考えられる。感染後 1～3 ヶ月の潜伏期を経て急性肝炎を発症するが、免疫力の正常な成人が罹患した場合でも慢性肝炎になりやすく、慢性化率は 50～80%に達する。慢性化の要因としては次の点が考えられている(図 2)。第一に HCV が RNA ウイルスであり、変異しやすいことが挙げられる。特にエンベロープ蛋白質のアミノ末端は非常に変異しやすく、超可変領域(hypervariable region：HVR)と呼ばれ、中和抗体からのエスケープ機序に関与していると考えられている。第二に HCV が正常のウイルス排除機構から巧みに逃れるエスケープ変異を有することが考えられる。HCV 蛋白質は様々な宿主因子と相互作用することが報告され、複製に関与する宿主因子と病原性に関与する

ものとは大別される。非構造蛋白質の NS3 と NS4A の複合体は TLR3 や RIG-I によるウイルス感染応答シグナルを阻害することが近年明らかになっている(7)。また非構造蛋白質の NS5A はインターフェロン応答に関わる PKR(2 本鎖 RNA 依存性プロテインキナーゼ)や 2-5OAS(2'5'オリゴアデニル酸合成酵素)を阻害するはたらきを有する。第三の要因としては HCV がリンパ球に感染することにより免疫機構を錯乱することが考えられているが、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

慢性の C 型肝炎は 10~20 年を経て肝硬変に進展し、やがて高率に原発性肝癌を発生する。わが国では毎年 2 万数千人が HCV による原発性肝癌で死亡しているが、これは原発性肝癌の約 80%にあたる。HCV 自体は逆転写酵素を持たないため、肝細胞染色体 DNA への組込みは認められない。HCV による肝細胞の癌化の要因としては次の点が考えられる(図 3)。前述のように、感染に伴って産生される HCV 蛋白質は様々な宿主因子と相互作用するために、肝細胞機能への影響が考えられる。特にコア蛋白質は強い免疫原性を有するほか、脂肪肝の誘発や転写因子活性化など様々な機能を有することが報告されている。癌原蛋白質の活性化や癌抑制蛋白質の機能阻害も考えられ、NS3 は癌抑制蛋白質の p53 に会合して活性を抑制していることが報告されている。NS4A はアポトーシスへの関与が明らかになっている。NS5A は Src 型のチロシンキナーゼやその会合蛋白質と相互作用し、その活性を調節する。これらの要因に加えて、慢性 C 型肝炎となった後に、長期にわたり持続的な炎症と肝再生を繰り返すことにより、細胞内の遺伝子変異が蓄積することも大きな要因となると考えられる。

#### 研究ツールの開発

HCV の発見以来、ウイルスの培養実験系が存在しないことが HCV の基礎研究の妨げになってきた。1999 年になって、ハイデルベルグ大学の Bartenschlager 博士らのグループにより画期的な HCV レプリコンシステムが報告された(図 4)(2)。このシステムは HCV (Con 1 株)の構造蛋白質領域と非構造蛋白質領域の一部を取り除き、代わりにネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたプラスミドを作成し、それを鋳型として試験管内で合成された RNA を培養細胞(Huh-7 細胞など)にトランスフェクションし、ネオマイシンで選択培養を行う。生き残った細胞では HCV レプリコン RNA が複製し、同時に HCV 蛋白質も持続的に発現している。このシステムを用いることで HCV の培養細胞内での増殖複製が観察可能となった。このシステムは HCV のゲノムの一部であるということから subgenomic replicon(SGR)と呼ばれている。さらに、全長の HCV ゲノム(O 株)を用いて、構造蛋白質と非構造蛋白質を発現する full genomic replicon (FGR)も開発されている(8)。レプリコン細胞では HCV RNA が効率よく複製しており、要因として複

製効率を非常に向上させるような適応変異(adaptive mutation)が考えられるが、これらは感染性の増強との因果関係はないと考えられている。なお、レプリコン細胞からは感染性粒子は産生されない。

これに対し、劇症肝炎患者から分離された HCV (JFH-1 株、2a 型)は培養細胞より感染性ウイルス粒子を産生し、チンパンジーにも感染可能であった(3)。更にレプリコン研究から同定された HCV 複製の感受性の高い細胞(Huh7.5 細胞)においては、細胞質内の 2 本鎖 RNA を検知してインターフェロン応答を誘導する RIG-I (retinoic acid inducible gene-I)に変異があることが明らかとなった。この細胞に、2a 型の J6 株の構造領域と JFH-1 株の非構造領域との感染性キメラウイルス(J6/JFH1)を導入すると、非常に高い感染力価( $10^4 \sim 10^5$ )を示す培養上清が調整可能となった(図 5)(4)。こうして効率の良いウイルス培養系が誕生し、HCV のライフサイクルの観察が容易になった。

#### C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構(1)―発癌機構―

肝組織の免疫組織染色の結果、HCV 感染によりシグナル伝達分子 Syk (Spleen tyrosine kinase)の細胞内局在パターンがびまん性から斑状に変化することが明らかとなった(9)。Syk はその名の通り脾臓から単離された非受容体型チロシンキナーゼで、マスト細胞やマクロファージの機能、B 細胞の分化に不可欠であることから、感染免疫応答に重要な分子であると考えられている(図 6)(10)。構造はアミノ末端から免疫系の受容体の細胞内共通モチーフ配列(ITAM)に結合する SH2 ドメイン、基質蛋白質をリン酸化するチロシンキナーゼドメイン、さらに両者をつなぐリンカー領域(調節部位)からなり、乳がんやメラノーマでは癌抑制蛋白質としての働きが報告されている(11)。最近では新規 Syk 阻害剤の開発がトピックスとなっており、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ、ITP、他に対する臨床応用の可能性が注目されている。

肝細胞において Syk は HCV 蛋白質の一つ NS5A と特異的に会合する。両者の会合様式を詳細に検討したところ、NS5A のアミノ末端部分が Syk との会合に関与することが明らかとなった(図 7)。さらに、NS5A との会合により Syk のチロシンキナーゼ活性が抑制されるが、その際 NS5A との会合に加え、NS5A の中央部分が Syk の阻害に関与することも明らかとなった。NS5A との会合は Syk による肝細胞内蛋白質のチロシンリン酸化も同様に抑制し、浸透圧ストレスを介するホスホリパーゼ C- $\gamma$ 1 のチロシンリン酸化も抑制した。以上より、HCV 蛋白質の発現により肝細胞癌が発症するメカニズムの一つとして、Syk を介する癌抑制シグナル伝達機構の阻害が考えられた(9)。

#### C 型肝炎ウイルスの病原性発現機構(2)―合併症―

HCV 感染症は脂質代謝異常症や 2 型糖尿病との関連が指摘されている。HCV 感染実験系を用いて解析を行ったところ、HCV 感染細胞では、細胞内へのグルコースの取り込みが有意に低下し、細胞をインターフェロン処理して HCV を消失させると、その現象が見られなくなった(図 8)(12)。その原因について調べたところ、肝細胞に発現するグルコーストランスポーター(GLUT)のうち、GLUT2 の細胞表面への発現が特異的に抑制されていることが明らかとなった。細胞をインターフェロン処理すると抑制効果は消失した。また GLUT2 の mRNA 産生量や、プロモーターの活性も低下していることが明らかとなった。プロテアソーム阻害剤の前処理により抑制効果が影響されないことから GLUT2 の蛋白質分解が促進した結果ではないと考えられる。HCV 患者由来の肝組織を免疫染色で調べた結果、GLUT2 の発現低下が確認された。以上より、HCV 蛋白質の発現により GLUT2 の発現が抑制され、肝細胞へのグルコース取り込みの低下と、それによる高血糖が引き起こされていることが示唆された(12)。

#### おわりに

本稿では、HCV の性状、病原性発現機構、研究ツールの開発について概説し、さらに私共の最新の知見について紹介した。なお本研究は神戸大学大学院医学研究科 堀田博教授との共同研究である。

#### Reference List

1. Choo, Q. L., G. Kuo, A. J. Weiner, L. R. Overby, D. W. Bradley, and Houghton, M.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
2. Lohmann, V., F. Korner, J. Koch, U. Herian, L. Theilmann, and Bartenschlager, R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113, 1999.
3. Wakita, T., T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto, Z. Zhao, K. Murthy, A. Habermann, H. G. Krausslich, M. Mizokami, R. Bartenschlager, and Liang, T. J.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat.Med.* 11:791-796, 2005.
4. Lindenbach, B. D., M. J. Evans, A. J. Syder, B. Wolk, T. L. Tellinghuisen, C. C. Liu, T. Maruyama, R. O. Hynes, D. R. Burton, J. A. McKeating, and Rice, C. M.:

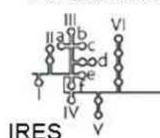


- Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309:623-626, 2005.
5. Moradpour, D., F. Penin, and Rice, C. M.: Replication of hepatitis C virus. *Nat.Rev.Microbiol.* 5:453-463, 2007.
  6. Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and Shimotohno, K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat.Cell Biol.* 9:1089-1097, 2007.
  7. Gale, M., Jr. and Foy, E. M.: Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 436:939-945, 2005.
  8. Ikeda, M., K. Abe, H. Dansako, T. Nakamura, K. Naka, and Kato, N.: Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 329:1350-1359, 2005.
  9. Inubushi, S., M. Nagano-Fujii, K. Kitayama, M. Tanaka, C. An, H. Yokozaki, H. Yamamura, H. Nuriya, M. Kohara, K. Sada, and Hotta, H.: Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein tyrosine kinase Syk. *J.Gen.Virol.* 89:1231-1242, 2008.
  10. Sada, K., T. Takano, S. Yanagi, and Yamamura, H.: Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *J.Biochem.* 130:177-186, 2001.
  11. Coopman, P. J., M. T. Do, M. Barth, E. T. Bowden, A. J. Hayes, E. Basyuk, J. K. Blencato, P. R. Vezza, S. W. McLeskey, P. H. Mangeat, and Mueller, S. C.: The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* 406:742-747, 2000.
  12. Kasai, D., T. Adachi, L. Deng, M. Nagano-Fujii, K. Sada, M. Ikeda, N. Kato, Y. H. Ide, I. Shoji, and Hotta, H.: HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J.Hepatol.* 50:883-894, 2009.

# HCVの構造

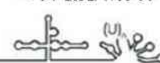
## ゲノム

5'非翻訳領域

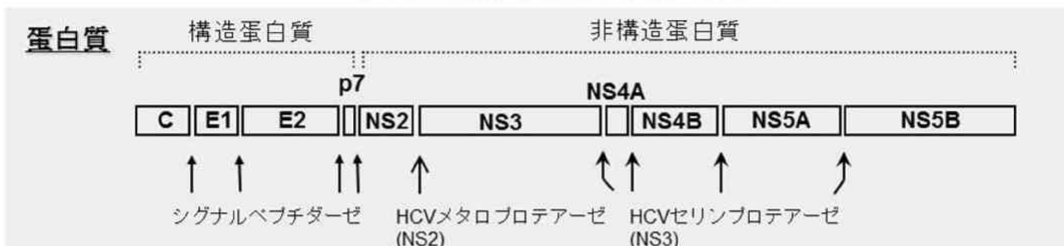


フラビウイルス科ヘパシウイルス属  
プラス鎖1本鎖RNA(9.6kb)

3'非翻訳領域



ORFから翻訳された前駆蛋白質の切断



## ウイルス粒子



直径55~65nm

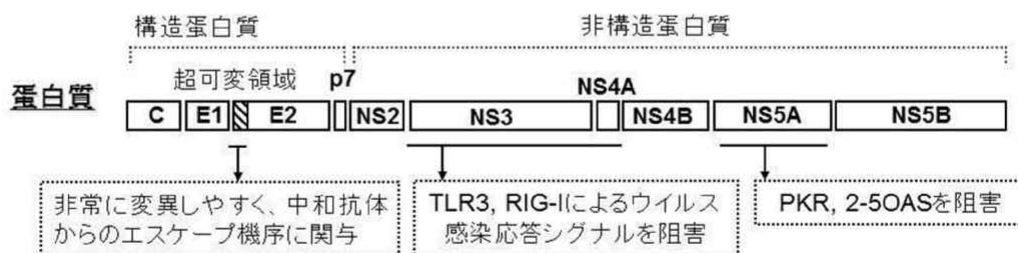
E2 : 膜蛋白質  
E1 : 膜蛋白質  
C : コア  
ゲノムRNA

p7 : イオンチャネル  
NS2 : メタロプロテアーゼ  
NS3 : セリンプロテアーゼ,  
RNAヘリカーゼ  
NS4A : NS3の安定化因子  
NS4B : ?  
NS5A : リン酸化蛋白  
NS5B : RNA 依存性RNAポリメラーゼ

# HCVによる慢性肝炎発症機序

標的細胞: 肝細胞とリンパ球

肝細胞障害の機序: リンパ球を介する肝細胞障害機構, アポトーシス



慢性化の要因

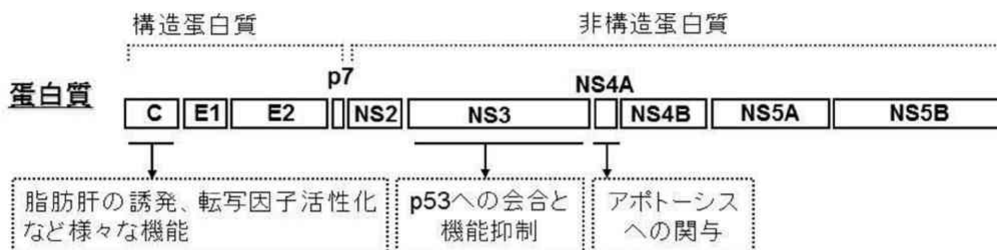
- ① RNAウイルスであり変異しやすい
- ② 免疫応答が不十分(排除機構から巧みに逃れるエスケープ変異)
- ③ リンパ球に感染し免疫機構を錯乱

PKR: dsRNA-dependent protein kinase  
2-5OAS: 2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素



## HCVによる肝癌発症機序

わが国では、約150万～200万人のHCV慢性感染者が存在し、毎年2万数千人がHCVによる原発性肝癌で死亡している（原発性肝癌の約80%）

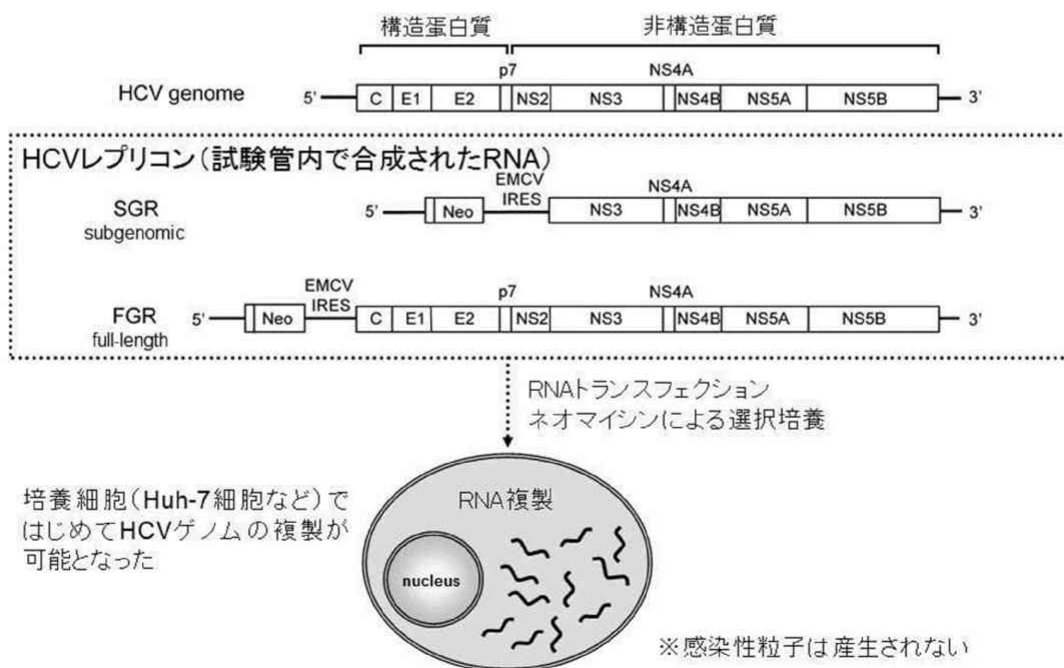


癌化の要因(可能性)

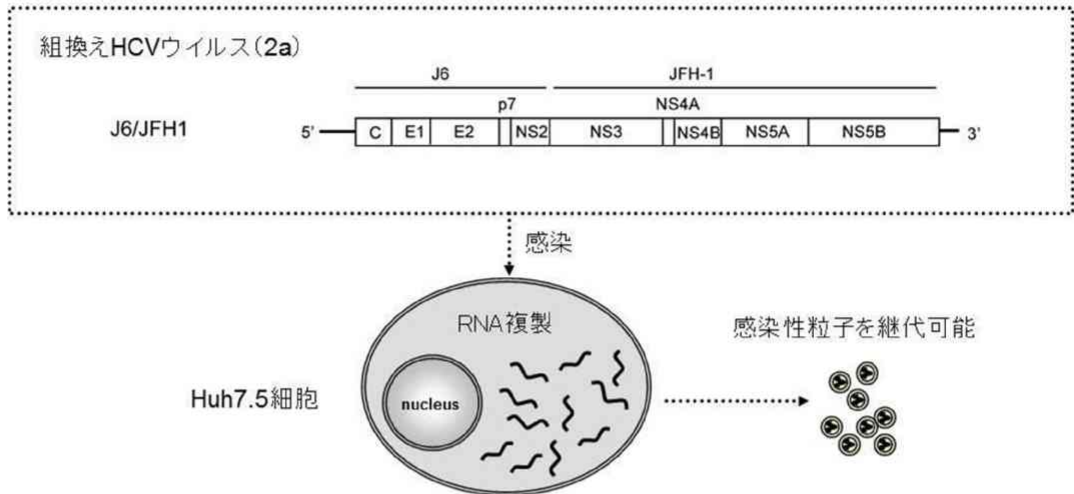
- ①肝細胞染色体DNAへのHCV遺伝子の組込みは認められない
- ②感染に伴って産生されるHCV蛋白質が宿主細胞機能に影響を及ぼす可能性
- ③癌原遺伝子産物の活性化や癌抑制遺伝子産物の機能阻害
- ④持続的な炎症、継続的な肝再生による遺伝子変異の蓄積

### ■研究ツールの開発

## HCVレプリコンシステム



## 感染性組換えHCV



## 非受容体型チロシンキナーゼSyk

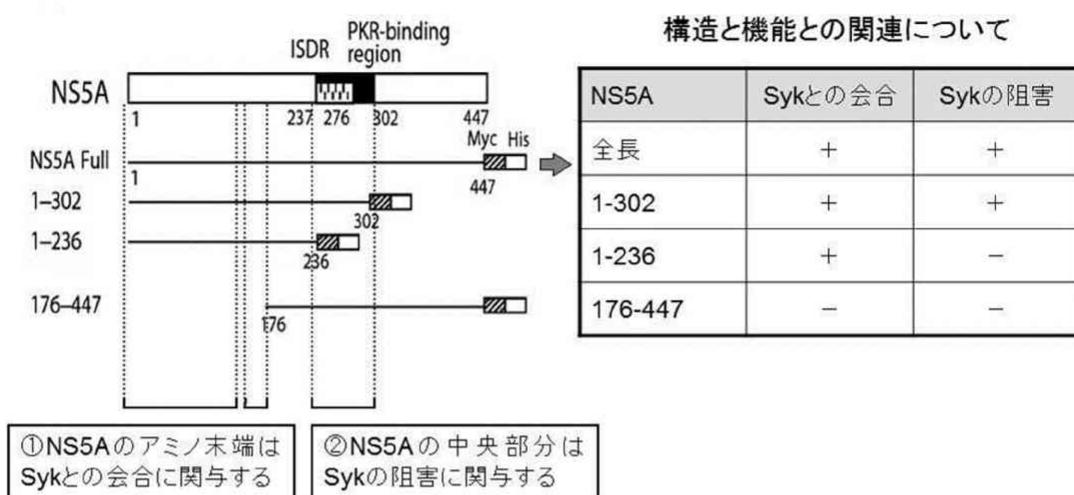
Syk: Spleen Tyrosine Kinase、1991年福井医科大学で単離  
マスト細胞やマクロファージの機能、B細胞の分化に不可欠  
感染免疫応答に重要な分子



癌抑制蛋白質としての働き: 乳癌やメラノーマなど

新規Syk阻害剤の開発: アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ、  
ITP、他に対する臨床応用の可能性が現在注目されている

## NS5AとSykの相互作用



## HCV複製による細胞内グルコース取り込み抑制

